

## 云南松居群遗传学研究的等位酶分析方法\*

虞泓<sup>1,2</sup> 钱韦<sup>2</sup> 黄瑞复<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 云南云南大学进化生态学研究实验室, 昆明 650091)

(<sup>2</sup> 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

**摘要** 针对 15 个云南松 *Pinus yunnanensis* 居群, 开展了 14 种酶系统的水平切片淀粉凝胶电泳实验, 在谱带遗传分析的基础上确定了 33 个等位酶位点及其等位基因。其中有 32 个等位酶位点是多态的 (有 2 个以上的等位基因), 只有一个单态位点 *Dia* - 4。有 3 个等位基因的位点有 *Lap* - 1、*Lap* - 2、*Aa* - 3、*Skd* - 1、*Skd* - 2、*Adh* - 1、*Adh* - 3、*Gdh*、*Pgd* - 1、*Pgm* - 1、*Pgm* - 3、*Pgi* - 1、*Pgi* - 3、*Mdh* - 1、*Me*、*G6pd*、*Dia* - 1、*Tpi* - 1、*Tpi* - 2、*Tpi* - 3 和 *Tpi* - 4, 有 4 个等位基因的位点有 *Skd* - 3、*Adh* - 2、*Pgd* - 2、*Mdh* - 2、*Mdh* - 3、*Mdh* - 4 和 *Dia* - 2, 有 5 个等位基因的位点有 *Aat* - 1 和 *Dia* - 3。云南松居群的等位基因平均数  $A = 2.1$ , 在松属中居于中上水平。本研究揭示了云南松居群酶位点及其等位基因带谱的变异式样, 为松属植物的遗传多样性研究提供了一批酶位点及其等位基因的参考图谱。

**关键词** 云南松, 居群遗传学, 等位酶

**分类号** Q 943

## Allozyme Method in Study on Population Genetics of *Pinus yunnanensis*

YU Hong<sup>1,2</sup> QIAN Wei<sup>2</sup> HUANG Rui - Fu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Laboratory of Evolutionary Ecology, Yunnan University, Kunming 650091)

(<sup>2</sup> Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

**Abstract** The genetic diversity in fifteen populations of *Pinus yunnanensis* Franch. were studied by starch gel electrophoresis in the present work. Fourteen enzyme systems, presumably coded by 33 allozyme loci and their alleles were scored, and 32 were polymorphic with only one monomorphic locus (*Dia* - 4). The loci with three alleles are *Lap* - 1, *Lap* - 2, *Aat* - 3, *Skd* - 1, *Skd* - 2, *Adh* - 1, *Adh* - 3, *Gdh*, *Pgd* - 1, *Pgm* - 1, *Pgm* - 3, *Pgi* - 1, *Pgi* - 3, *Mdh* - 1, *Me*, *Idh* - 1, *Idh* - 2, *G6pd*, *Dia* - 1, *Tpi* - 1, *Tpi* - 2, *Tpi* - 3 and *Tpi* - 4, those with four alleles are *Skd* - 3, *Adh* - 2, *Pgd* - 2, *Mdh* - 2, *Mdh* - 3, *Mdh* - 4 and *Dia* - 2, and those with five alleles are *Aat* - 1 and *Dia* - 3. The mean number of alleles per locus is  $A = 2.1$  in the populations of *P. yunnanensis*. The bands represented loci and alleles of *P. yunnanensis* are showed in the paper. The paper provides the genetic diversity and evolution of *Pinus* with comparative diagrams of allozymes.

**Key words** *Pinus yunnanensis*, Population genetics, Allozyme

\* 国家自然科学基金资助项目 (39500024)

1997 - 12 - 11 收稿, 1998 - 07 - 16 接受发表

云南松 *Pinus yunnanensis* Franch. 是分布于我国西南季风影响下的中亚热带气候条件下的重要树种。在云南高原上，从南到北，从东到西，从海拔 800 m 的河谷至 3 200 m 的亚高山地带，均有大面积分布，分布面积占云南省森林面积的 70%。云南松是以云南高原为其起源和分布中心，与我国东部亚热带分布的马尾松 *P. massoniana* Lamb. 是同属之间的地理替代种，在云南西北横断山区与高山松 *P. densata* Mast. 毗连，在云南西南部则与思茅松 *P. kessiya* var. *langbianensis* (A. Chev.) Gaussen 邻接（吴征镒等，1987；姜汉桥，1984）。

胡志昂（1983）和李启任（1984a, 1984b, 1993）曾应用垂直板状聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对云南松的过氧化物酶做过大量研究，但仅限于生化表型的描述，即谱带多少和迁移率的描述，没有分析其谱带背后的遗传本质，加之，多为个别取样，而不是居群取样，故难以获得云南松遗传多样性资料和信息。其实 Gottlieb（1977）早已指出用来自不同类群的电泳资料直接进行比较，如简单地计数谱带数目、迁移率等等，这种做法不仅从生化角度上看是有缺陷的，而且会丢弃电泳方法中同源性比较和基因频率定量分析的许多优点。近年来，Wang（1990a, 1990b, 1994）用分子生物学技术研究高山松、云南松和油松 *P. tabulaeformis* Carr. 的遗传多样性与起源，认为高山松起源于第三纪云南松与油松的杂交种。该研究将云南松的遗传多样性研究推到分子研究的新水平。她应用淀粉凝胶电泳技术研究分析了一个云南松居群的 7 个酶系统的 13 个等位酶位点，得出较好的结果，对研究云南松居群系统的遗传多样性具有重要的参考价值。等位酶实验的分析方法为在基因位点（或称座位，locus）水平研究遗传多样性、进化生态学和分子生态学开辟了广阔而实用的前景（王中仁，1994a, 1994b；葛颂，1994），通过遗传分析所找到的基因位点才是可靠的遗传标志，利用这些遗传标志才能有效的度量居群中遗传变异的大小及其分布，进而探讨进化问题并为类群划分的系统发育推断提供依据（Crawford, 1990；葛颂，1994）。

本研究以云南松为试材，在开展 15 个居群 18 种酶系统的同工酶实验的基础上，从中筛选分离良好、谱带清晰的 14 种酶系统，在谱带遗传分析的基础上确定了 33 个酶基因位点及其等位基因，以便利用这批等位酶遗传标志研究云南松居群的遗传结构。

## 1 材料与方法

所用材料均取自云南松天然居群，共 15 个居群（YU01, YU02, YU03, YU06, YU07, YU08, YU09, YU10, YU15, YU19, YU23, YU25, YU26, YU27, YU28），本文重点以云南松 15 个居群说明其等位基因位点及其等位基因的变异式样。这 15 个云南松居群的地理位置和生境详见表 1。

每个居群平均随机确定 20 单株，多的不超过 45 株。每单株随机采取 15 ~ 20 个未开裂成熟球果。带回实验室分别干燥、脱籽、净种，最后保存在室温（20℃）下备用。由于裸子植物种子可分离出二倍体的胚和单倍体的胚乳（♀配子体），故直接利用单倍体胚乳的电泳酶谱来分析是否符合 Mendel 分离规律，从而确定谱带所代表的等位基因位点。用单倍体胚乳的同工酶谱带分析酶基因位点和等位基因，简单、方便、准确，而且无论是单聚体酶，还是二聚体酶，甚至是三聚或四聚体酶，由于每个位点只显示一条谱带，其位置

表 1 云南松 15 个居群的地理位置和生境

Table 1 Localities and habitats of 15 populations in *Pinus yunnanensis*

| Pop. No. | Pop. name      | Locality  | Altitude | Latitude | Longitude |
|----------|----------------|-----------|----------|----------|-----------|
| YU01     | Hutiaoxia      | Zhongdian | 1900 m   | 27°12'N  | 100°03'E  |
| YU02     | Dalanpianwa    | Zhongdian | 2000 m   | 27°03'N  | 99°11'E   |
| YU03     | Tianchi        | Yunlong   | 2600 m   | 25°53'N  | 99°11'E   |
| YU06     | Litouchun      | Eryuan    | 2100 m   | 26°07'N  | 100°18'E  |
| YU07     | Chanshan       | Dali      | 2100 m   | 25°36'N  | 100°12'E  |
| YU08     | Qingshuijiang  | Qiubei    | 1600 m   | 24°20'N  | 104°32'E  |
| YU09     | Ailaoshandonpo | Jindong   | 2480 m   | 24°33'N  | 101°03'E  |
| YU10     | Xishan         | Kunming   | 2100 m   | 24°58'N  | 102°38'E  |
| YU15     | Nixishangqio   | Zhongdian | 2600 m   | 28°08'N  | 99°27'E   |
| YU19     | Bijiashan      | Anning    | 2450 m   | 24°56'N  | 102°30'E  |
| YU23     | Qiongzhusi     | Kunming   | 2300 m   | 25°03'N  | 102°37'E  |
| YU25     | Linchang       | Linchang  | 2400 m   | 23°43'N  | 100°08'E  |
| YU26     | Yating         | Leye      | 950 m    | 24°56'N  | 106°18'E  |
| YU27     | Huaping        | Leye      | 800 m    | 24°49'N  | 106°19'E  |
| YU28     | Yilai          | Tianling  | 700 m    | 24°42'N  | 106°09'E  |

又直接代表一个等位基因, 因此比二倍体胚更容易确定等位基因位点和等位基因。若按杂合单株的某一位点的两个等位基因符合 1:1 分离规律的情况, 则漏掉一个等位基因将杂合体错定为纯合体的概率为  $(1/2)^{k-1}$ , 其中  $k$  为杂合单株所分析的胚乳数。本研究每单株平均分析 8 粒种子的胚乳, 错定基因同型的概率为 0.008, 即错定概率不到 1%。本实验每单株随机取自由授粉种子 30 粒放在湿润培养皿中置于 25℃ 的温箱中, 种子露白后, 剥取每粒种子的单倍体胚乳用于实验。分别取每粒胚乳加 2 滴研磨缓冲液, 在冰浴中研磨提取。研磨缓冲液为 Soltis *et al.* (1983) 的 Tris-HCl (pH7.5) 配方, 再加 0.2% 巯基乙醇和 10% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。沁子 (wicks) 选用新华 III 号滤纸, 制成 2 mm × 6 mm 大小, 直接吸取研磨后的提取液。在本实验中, 为了提高工作效率, 将单株的每 2 粒胚乳混合一起研磨提取, 上样电泳。若 2 粒胚乳某一位点的等位基因相同则出现一条谱带, 若等位基因不同则出现一高一低的 2 条谱带, 很容易判断等位基因的类型及其数目。由于每 2 粒胚乳只占据凝胶板的一个电泳泳道, 故效率比一粒胚乳占据一个电泳泳道提高了一倍。采用水平切片淀粉凝胶电泳技术, 使用王中仁 (1996) 设计由北京六一仪器厂生产的“SG-WZ”型 170 mL 水平切片淀粉凝胶电泳槽, 通过大量对比实验, 选出 2 种电极缓冲液和相应的凝胶缓冲液系统 (表 2) 分别用于不同的酶系统。

电泳在 4℃ 冰箱中进行, 采用 40 mA 稳流电泳 5~6 h, 待溴酚蓝移至电泳槽顶端, 停止电泳, 切胶染色。染色液配方 (包括液染和胶染) 采用 Soltis *et al.* (1983) 和王中仁 (1996) 配方。染色后即时记录谱带和照相, 并将电泳效果好的胶片制成干片。方法是: 用半透性膜玻璃纸覆盖胶的两面, 夹于平板上使其渐干, 为防止开裂, 涂少许甘油。

等位酶位点和等位基因的命名按常规, 以酶的缩写字母代表该酶系统, 连字符号后数据代表该酶不同的位点, 愈靠近正极 (迁移率愈大) 的等位基因以 A 代表, 其次以 B 代表, 照此类推。由于没有用孢子体 (二倍体) 做试材, 当有不表达 (Silent) 等位基因时, 不能准确确定其位置, 故将其作为最后一个等位基因。

表 2 电泳缓冲液系统配方和淀粉型号及浓度  
Table 2 The electrode buffer, gel buffer and Sigma starches.

| No. | Electrode buffer                                                                                                                                  | Gel buffer                                                                                                                                   | Sigma starch<br>and proportion |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| B   | 0.40 mol Citric acid, trisodium salt;<br>117.64 g Citric acid, trisodium salt<br>dihydrate 1.0 mol HCl to pH 7.0<br>H <sub>2</sub> O up to 100 mL | 0.010 mol L - histidine mono HCl 2.10 g L -<br>histidine mono HCl<br>1.0 mol NaOH to pH 7.0 H <sub>2</sub> O up to 1000 mL                   | 1(S - 4501):1(S - 5651)<br>12% |
|     |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                              |                                |
| A   | 0.040 mol Tris, 0.105 mol Citric acid<br>48.46 g Tris, 22.17 g Citric<br>acid·H <sub>2</sub> O pH 8.0<br>H <sub>2</sub> O up to 1000 mL           | 0.009 mol Tris, 0.005 mol L - histidine mono<br>HCl; 10.40 g Tris 9.60 g L - histidine Mono-<br>tel pH 8.0<br>H <sub>2</sub> O up to 1000 mL | 3(S - 4501):1(S - 5651)<br>13% |
|     |                                                                                                                                                   |                                                                                                                                              |                                |

Buffer system B: a modification of Soltis' 1 # (1983) ; Buffer system A: conkle et al. (1982)

从 18 种酶系统中筛选出 14 种分离良好、谱带清晰的酶系统（表 3）。根据不同酶谱带在个体和居群的分布，参考裸子植物有关酶系统的文献，尤其是松属植物的等位酶分析资料，最终确定了 14 种酶系统共 33 个等位酶位点。

表 3 14 种酶系统的名称，缩写和适用的缓冲系统  
Table 3 14 enzymes' name, EC number and their buffer systems

| 酶系统名称<br>Enzyme system                                  | 缩写<br>Abbreviation | 酶代码<br>EC no. | 缓冲系统<br>Buffer system |
|---------------------------------------------------------|--------------------|---------------|-----------------------|
| 亮氨酸氨基肽酶 Leucine aminopeptidase                          | LAP                | 3.4.11.01     | A                     |
| 天冬氨酸转氨酶 Aspartase aminotransferas                       | AAT                | 2.6.01.01     | A                     |
| 莽草酸脱氢酶 Shikimate dehydrogenase                          | SKD                | 1.1.01.25     | B                     |
| 乙醇脱氢酶 Alcoholdehydrogenase                              | ADH                | 1.1.01.01     | B; A                  |
| 谷氨酸脱氢酶 Glutamate dehydrogenase                          | GDH                | 1.4.01.02     | B; A                  |
| 6 - 磷酸葡萄糖脱氢酶 Phosphogluconate dehydrogenase             | PGD                | 1.1.01.44     | B                     |
| 磷酸葡萄糖变位酶 Phosphogluconate dehydrogenase                 | PGM                | 2.7.05.01     | B                     |
| 磷酸葡萄糖异位酶 Phosphoglucoisomerase                          | PGI                | 5.3.01.09     | B                     |
| 苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase                             | MDH                | 1.1.01.37     | B                     |
| 苹果酸酶 Malic enzyme                                       | ME                 | 1.1.01.40     | B                     |
| 异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase                        | IDH                | 1.1.01.42     | B                     |
| 葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶 Glucose - 6 - phosphate delihydrogenase | G6PD               | 1.1.1.49      | B                     |
| 心肌黄酶 Diaphorase                                         | DIA                | 1.6.04.03     | B                     |
| 磷酸丙糖异构酶 Triose - phosphate isomerase                    | TPI                | 5.3.01.01     | B                     |

2 结果与讨论

2.1 等位酶位点和等位基因的确定

亮氨酸氨基肽酶 Leucine amino peptidase (LAP) LAP 又称氨基肽酶 (Aminopeptidase, 简称 AMP), 在松属植物中为两个位点编码 (Wang, 1990)。本研究极为稳定，等位基因 a 或 c 仅在极少数居群的少数个体中出现，LAP 两位点的电泳谱带和编码等位基因见图 1 和图版 I:1。由于裸子植物的胚乳是单倍体，每个泳道点两粒胚乳的混合样，若 2 粒胚乳某一位点的等位基因相同则出现一条谱带，若等位基因不同则出现一高一低的 2 条谱带，很容易判断等位基因的类型及其数目，电泳带谱结果清楚，记录等位基因简洁明

了, 不会发生混淆。图 1 中, 泳道 1 的两粒胚乳的基因是相同, 是 a 和 a; 同样, 泳道 3 的是 b 和 b; 泳道 5 的是 c 和 c; 泳道 2 的 2 粒胚乳的基因分别是 a 和 b; 泳道 4 的 2 粒胚乳的基因分别是 b 和 c。

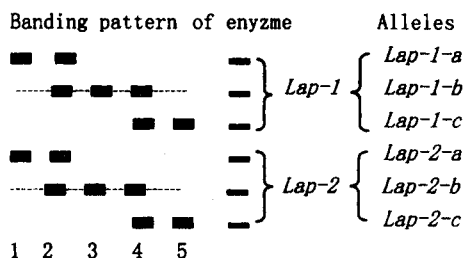


图 1 LAP 两个位点的电泳谱带和编码等位基因, 虚线示最常见谱带 (等位基因 b)。

Fig. 1. Banding pattern of two loci in LAP. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c.

磷酸葡萄糖异构酶 Phosphoglucisomerase (PGI) PGI 在本研究材料中, 有 3 个活性区, 由于 *Pgi* - 2 位点的谱带不清晰, 不予分析, 故只分析 *Pgi* - 1 和 *Pgi* - 3 两个位点, PGI 两个位点的酶谱带和编码等位基因见图 2 和图版 II: 4。

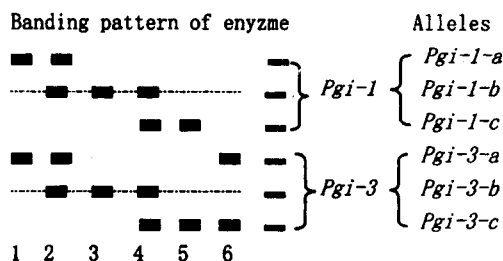


图 2 PGI 两位点的酶电泳谱带和编码等位基因, 虚线示最常见谱带 (等位基因 b)。

Fig. 2. Banding pattern of two loci in PGI. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c; 6. alleles: a and c.

磷酸葡萄糖变位酶 Phosphoglucumutase (PGM) PGM 受两个位点控制 (Wang, 1990), 在所研究材料中, PGM 有 3 个活性区, 由于 *Pgm* - 2 位点的谱带不清晰, 未加分析, 故只分析 *Pgm* - 1 和 *Pgm* - 3 两个位点, PGM 两个位点的酶谱带和编码等位基因见图 3 和图版 II: 1~2。

天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase (AAT) AAT 又被称为谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (Glutamate oxaloacetate transaminase, 简称 GOT), 是植物中研究很多的一种酶 (Gottlieb, 1982), 存在于植物细胞的细胞液, 叶绿体, 线粒体和微体中, 该酶通常受 2~4 个位点控制, 是二聚体结构 (Gottlieb, 1973; Kephart, 1990), 在某些类群中也有单聚体酶的报道 (Cai and Chinnappa, 1989)。松属植物中, 可检测 4 个活性区 (Bonnet - Masimbert, 1979; Fowler and Morris, 1977; 葛颂, 1988), 或 3 个活性区或 2 个活性区 (Ledig and Conkle, 1983; Wang, 1990)。本研究发现, AAT 受 4 个位点控制, 但由于 *Aat* - 2 和 *Aat* - 4 酶

带不清晰，有的个体出现，有的个体不出现，无法分析，故只利用 *Aat* - 1 和 *Aat* - 3 这 2 个位点。这 2 个位点的电泳谱带和编码等位基因见图 4 和图版 I：2~3。

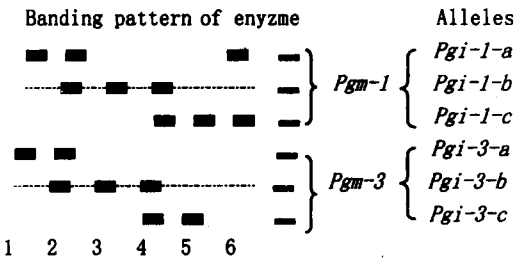


图 3 PGM 两位点的酶电泳谱带和编码等位基因，虚线示最常见谱带（等位基因 b）。  
Fig. 3. Banding pattern of two loci in PGM. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c; 6. alleles: a and c.

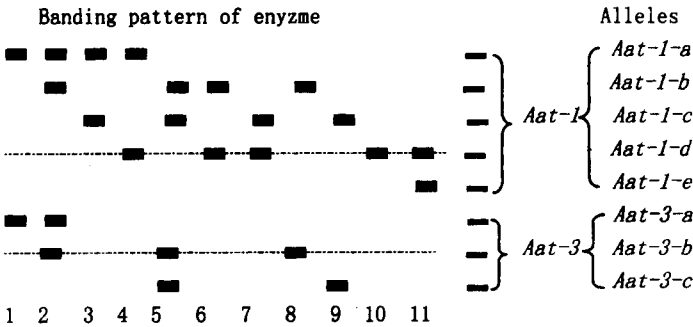


图 4 AAT 两位点的酶电泳谱带和编码等位基因，虚线示最常见谱带（等位基因 d 和 b）。  
Fig. 4. Banding pattern of two loci in AAT. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: a and c; 4. alleles: a and d; 5. alleles: b and c; 6. alleles: b and d; 7. alleles: c and d; 8. alleles: b and b; 9. alleles: c and c; 10. alleles: d and d; 11. alleles: d and e.

6- 磷酸葡萄糖脱氢酶 Phosphogluconate dehydrogenase (PGD) PGD 在本研究材料中为两个位点控制，*Pgd* - 1 位点共有 3 个等位基因，*Pgd* - 2 位点共有 4 个等位基因。实际酶谱中，*Pgd* - 2 位点的等位基因 a 的谱带与 *Pgd* - 1 位点的等位基因 b 的谱带位置接近或重迭。PGD 两位点的酶谱带和编码等位基因见图 5 和图版 I：5~6。

异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase (IDH) IDH 在本研究材料中受两个位点控制，其中，*Idh* - 1 位点的酶为二聚体结构，当两粒胚乳的等位基因分别为 a 和 b 时，放在一起研磨、上样、电泳，发现少数情况下两条不同的单肽链发生聚合形成与杂合二倍体一样的酶谱带，即 3 条谱带，而不是一高一低的 2 条谱带。IDH 两位点的酶电泳谱带和编码等位基因见图 6 和图版 II：7。

乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase (ADH) ADH 在本研究中，受 3 个位点控制，有 3 个活性区，*Adh* - 1 位点有 1~3 个等位基因，*Adh* - 2 位点有 1~4 个等位基因，*Adh* - 3 位点有 1~3 个等位基因。ADH3 个位点酶谱带和编码等位基因见图 7 和图版 I：4。

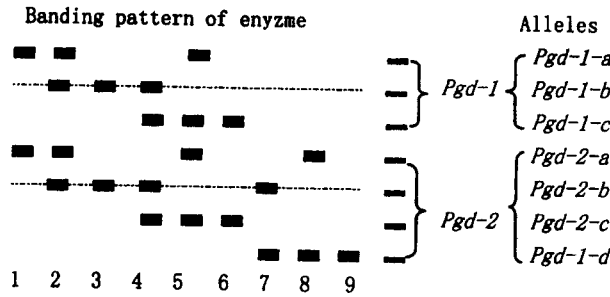


图 5 PGD 两位点的酶电泳谱带和编码等位基因, 虚线示最常见谱带 (等位基因 b)。  
Fig. 5. Banding pattern of two loci in PGD. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: a and c; 6. alleles: c and c; 7. alleles: b and d; 8. alleles: a and d; 9. alleles: d and d.

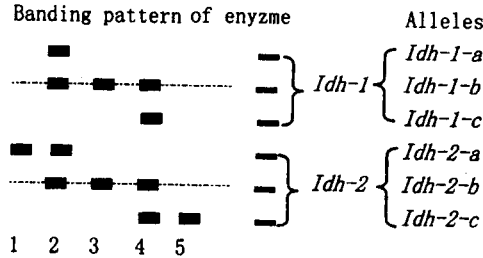


图 6 IDH 两位点的酶电泳谱带和编码等位基因, 虚线示最常见谱带 (等位基因 b)。  
Fig. 6. Banding pattern of two loci in IDH. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c.

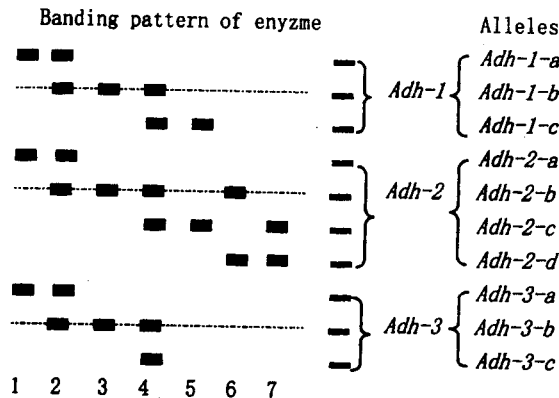


图 7 ADH 两位点的酶电泳谱带和编码等位基因, 虚线示最常见谱带 (等位基因 b)。  
Fig. 7. Banding pattern of three loci in ADH. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c; 6. alleles: b and c; 7. alleles: c and d.

莽草酸脱氢酶 Shikimate dehydrogenase (SKD) SKD 在 Wang (1990) 研究的松属材

料中有两个位点，且 *Skd* - 1 位点等位基因在油松（*P. tabulaeformis*）居群中多达 5 个，在云南松居群中共有 2 个，在高山松居群中有 4 个，本研究中，SKD 有 3 个等位酶位点，*Skd* - 1 位点通常有 2 个等位基因，少数居群的少数个体有第 3 个等位基因，*Skd* - 2 位点有 1~3 个等位基因，*Skd* - 3 位点有 1~4 个等位基因。实际电泳酶谱中 *Skd* - 3 的等位基因 a 的谱带位置与 *Skd* - 2 的等位基因 b 的谱带位置接近或重迭。SKD 3 个位点的酶谱带和编码等位基因见图 8 和图版 I：9。

谷氨酸脱氢酶 Glutamate dehydrogenase (GDH) GDH 在 Wang (1990) 研究材料中只有一个位点，在本研究中，GDH 有两个染色活性区但靠正极的谱带着色很浅，似乎时有时无，不易判别，故此位点无法分析，只分析靠负极的位点，GDH 位点的酶电泳谱带和编码等位基因见图 9 和图版 I：8。

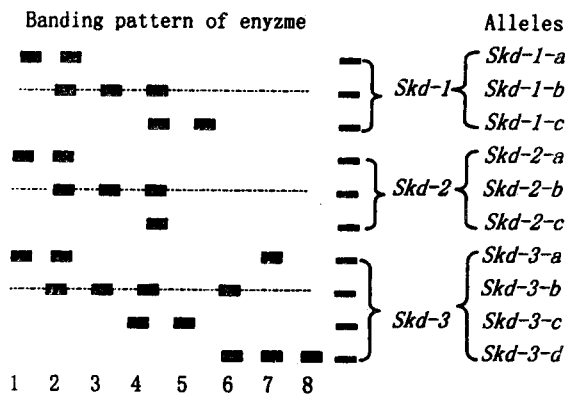


图 8 SKD 两位点的酶电泳谱带和编码等位基因，虚线示最常见谱带（等位基因 b）。

Fig. 8. Banding pattern of three loci in SKD. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c; 6. alleles: b and d; 7. alleles: a and d; 8. alleles: d and d.

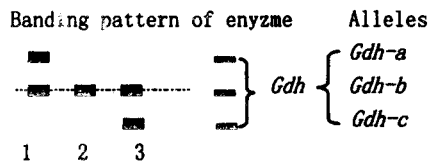


图 9 GDH 位点的酶电泳谱带和编码等位基因，虚线示最常见谱带（等位基因 b）。

Fig. 9. Banding pattern of one locus in GDH. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and b; 2. alleles: b and b; 3. alleles: b and c.

葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶 Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase (G6PD) G6PD 在本研究材料中有 2 个活性区，靠近负极位点的等位酶谱带着色浅不清晰，本研究未采用，仅采用靠近正极的位点用于分析。G6PD 一个位点的酶电泳谱带和编码等位基因见图 10 和图版 II：8。

苹果酸酶 Malic enzyme (ME) ME 在本研究材料中有 4~5 个活性区，但除了靠负极的带谱稳定表达外，其余带谱表达不稳定，时有时无，无法分析，故本研究只分析靠负极的一个位点。ME 一个位点的酶电泳谱带和编码等位基因见图 11 和图版 I：10。

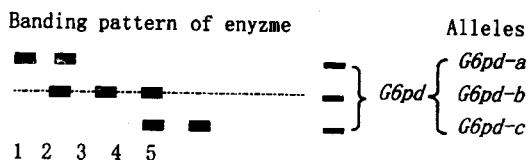


图 10 G6PD 位点的酶电泳谱带和编码等位基因，虚线示最常见谱带（等位基因 b）。

Fig. 10. Banding pattern of one locus in G6PD. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c.

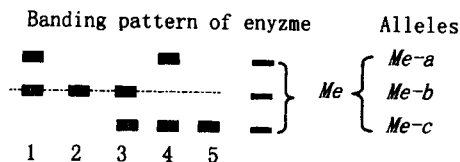


图 11 ME 位点的酶电泳谱带和编码等位基因，虚线示最常见谱带（等位基因 b）。

Fig. 11. Banding pattern of one locus in ME. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c.

苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase (MDH) MDH 是松属植物中研究较多的一种同工酶，发现在松属植物中 MDH 受 4 个位点控制 (Yeh and Layton, 1979; Malley *et al*, 1979; Wheeler and Guries, 1982; Woods *et al*, 1983; 葛颂, 1988)。而 Wang (1990) 在其研究材料分析了 MDH 的 2 个位点。也不例外，本研究材料 MDH 受 4 个位点控制，其中，*Mdh* - 2、*Mdh* - 3 或 *Mdh* - 4 这 3 个位点均有不表达的 (salient) 等位基因 d。MDH 4 个位点的酶谱带和编码的等位基因见图 12 和图版 I：7。

心肌黄酶 Diaphorase (DIA) DIA 在本研究材料中有 5 个活性区，但靠近阴极的位点，其酶电泳谱带着色浅，时出现，时不出现。故 *Dia* - 5 位点无法分析。本研究共分析了 *Dia* - 1、*Dia* - 2、*Dia* - 3 和 *Dia* - 4 四个位点，其中，*Dia* - 2 和 *Dia* - 3 位点有一不表达的 (salient) 等位基因 d 和 e，实际酶谱 *Dia* - 3 位点的等位基因 a 的谱带位置与 *Dia* - 2 位点的等位基因 b 的谱带位置接近或重迭。*Dia* - 4 位点全为单态位点。DIA 4 个位点的酶电泳谱带和编码等位基因见图 13 和图版 II：5~6。

磷酸丙糖异构酶 Triose - phosphate isomerase (TPI) TPI 在本研究材料中有 4 个活性区，TPI 4 个位点均较为稳定，以等位基因 b 的谱带最为常见，只有少数居群的极少数个体出现等位基因 a 或 c 的谱带。TPI 这 4 个位点的酶电泳谱带和编码等位基因见图 14 和图版 II：3。

在所研究的 15 个云南松居群 33 个基因位点中，有 32 个基因位点是多态的 (有 2 个以上的等位基因)，只有一个单态位点 *Dia* - 4。有 3 个等位基因的位点有 *Lap* - 1、*Lap* - 2、*Aat* - 3、*Skd* - 1、*Skd* - 2、*Adh* - 1、*Adh* - 3、*Gdh*、*Pgd* - 1、*Pgm* - 1、*Pgm* - 3、*Pgi* - 1、*Pgi* - 3、*Mdh* - 1、*Me*、*Idh* - 1、*Idh* - 2、*G6pd*、*Dia* - 1、*Tpi* - 1、*Tpi* - 2、*Tpi* - 3 和 *Tpi* - 4。有 4 个等位基因的位点有 *Skd* - 3、*Adh* - 2、*Pgd* - 2、*Mdh* - 2、*Mdh* - 3、*Mdh*

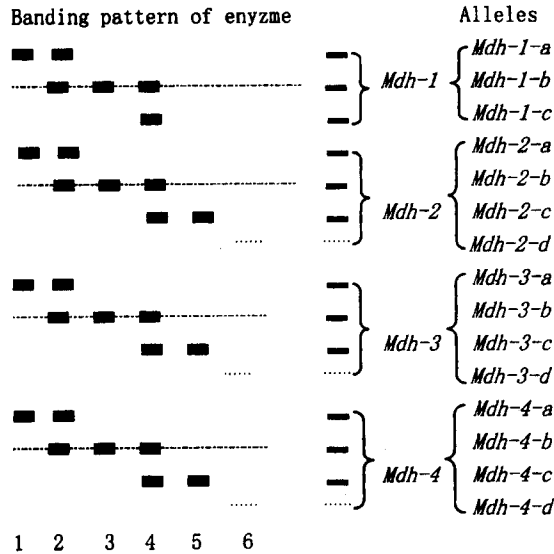


图 12 MDH 4 个位点的酶电泳谱带和编码等位基因，虚线示最常见谱带（等位基因 b）。

Fig. 12. Banding pattern of four loci in MDH. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c; 6. alleles: d and d.

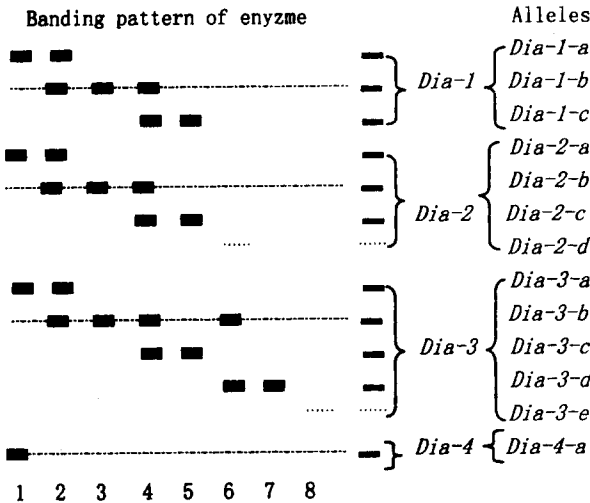


图 13 DIA 4 个位点的酶电泳谱带和编码等位基因，虚线示最常见谱带（等位基因 b 和 a）。

Fig. 13. Banding pattern of four loci in DIA. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles: a and a; 2. alleles: a and b; 3. alleles: b and b; 4. alleles: b and c; 5. alleles: c and c; 6. alleles: b and d; 7. alleles: d and d; 8. alleles: e and e.

-4 和 *Dia* - 2，有 5 个等位基因的位点有 *Aat* - 1 和 *Dia* - 3（表 4）；本研究云南松居群的等位基因平均数  $A = 2.1$ 。葛颂（1988）研究马尾松 *P. massoniana* 显示居群中 *Ldh* - 1、*Ldh* - 2、*Mdh* - 3、*Mdh* - 4 位点具有 3 个等位基因是等位基因数最多的，居群等位基因平均数  $A = 1.7$ 。Wang（1990）研究表明云南松居群中 *Aat* - 3 和 *Fes* 位点具有 4 个等位基因

是等位基因数最多的, 居群等位基因平均数  $A = 2.2$ ; 高山松 *P. densata* 居群中 *Lap* - 2、*Aat* - 3、*Sdh* - 1 位点具有 4 个等位基因是等位基因数最多的, 居群等位基因平均数  $A = 2.5$ ; 油松 *P. tabulaeformis* 居群中 *Fes* 和 *Sdh* - 1 位点具有 5 个等位基因是等位基因数最多的, 居群等位基因平均数  $A = 2.8$ 。杨一平 (1989; 1991) 研究表明, 红松 *P. koraiensis* 居群中 *Est* - 1 位点具有 6 个等位基因是等位基因数最多的, 居群等位基因平均数  $A = 2.25$ ; 长白松 *P. sylvestris* var. *syvestriiformis* 居群等位基因平均数  $A = 2.19$ 。国外学者研究表明, 脂松 *P. resinosa* 居群等位基因平均数  $A = 1.0$  (Fowler, 1977); 陶松 *P. torreyana* 居群等位基因平均数  $A = 1.0$ , 指果松 *P. monticola* 居群等位基因平均数  $A = 2.4$ , 台地松 *P. punens* 居群等位基因平均数  $A = 1.3$ , 刺果松 *P. aristata* 居群等位基因平均数  $A = 1.6$ , 刚松 *P. rigida* 居群等位基因平均数  $A = 2.0$ , 朗格松 *P. longaveva* 居群等位基因平均数  $A = 2.4$ , 火炬松 *P. taeda* 居群等位基因平均数  $A = 3.7$ , 欧洲赤松 *P. sylvestris* 居群等位基因平均数  $A = 4.6$  (Hamrick, 1979; 1989)。由此可见, 云南松居群酶位点及其等位基因数的变异在松属中居于中等水平。

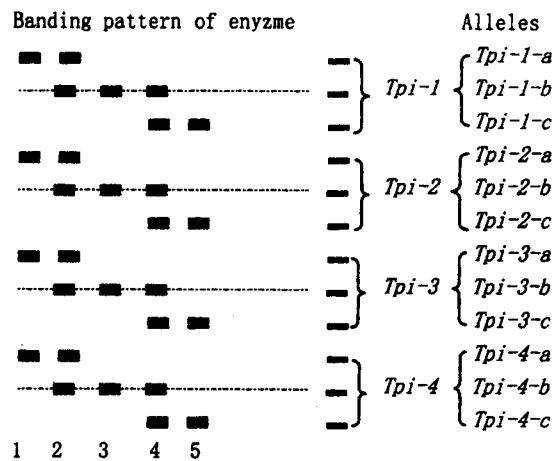


图 14 TPI 4 个位点的酶电泳谱带和编码等位基因, 虚线示最常见谱带 (等位基因 b)。

Fig. 14. Banding pattern of four loci in TPI. The bands on dotted lane are the most common allele. Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid). 1. alleles; a and a; 2. alleles; a and b; 3. alleles; b and b; 4. alleles; b and c; 5. alleles; c and c.

通过上述 15 个云南松居群 33 个酶位点的谱带遗传分析, 揭示了云南松居群酶位点及其等位基因带谱的变异式样, 这就为以后深入研究云南松居群的遗传结构与进化问题, 为国产松属植物的遗传多样性研究提供了一批酶位点及其等位基因变异的参考图谱, 以便于深入研究国产松属植物的遗传多样性及其林木遗传育种等方面的问题时参考。

## 参考文献

- 王中仁, 1994a. 植物遗传多样性和系统学研究中的等位酶分析. 生物多样性, 2 (1): 38~43; 2 (2): 91~95  
 王中仁, 1994b. 等位酶分析的遗传学基础. 生物多样性, 2 (3): 149~156; 2 (4): 213~219  
 王中仁, 1996. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 77~137

- 吴征镒, 朱彦承, 姜汉桥, 1987. 云南植被. 北京: 科学出版社, 417 ~ 441
- 李启任, 魏蓉城, 1984a. 云南松不同类型及近缘种的过氧化物酶同工酶. 云南大学学报 (自然科学版), **6** (10): 99 ~ 127
- 李启任, 魏蓉城, 武全安, 1984b. 昆明地区松科植物的过氧化物酶同工酶. 云南大学学报 (自然科学版), **6** (1): 128 ~ 138
- 李启任, 魏蓉城, 1993. 云南松性分化中的几种生理生化特性. 云南大学学报 (自然科学版), **15** (2): 172 ~ 177
- 杨一平, 王述礼, 尹瑞雪, 1989. 红松群体内和群体间同工酶变异的研究. 林业科学, **25**: 201 ~ 207
- 杨一平, 尹瑞雪, 张军丽, 1991. 长白松自然群体同工酶遗传多样性的研究. 东北林业科学, **19** (5): 17 ~ 25
- 胡志昂, 王洪新, 阎龙飞, 1983. 裸子植物的生化系统学 (一) ——松科植物的过氧化物酶. 植物分类学报, **21** (4): 423 ~ 432
- 姜汉桥, 1984. 云南松研究的若干问题. 云南大学学报 (自然科学版), **6** (1): 1 ~ 5
- 葛颂, 黄敏仁, 许农, 1987. 马尾松 GOT、LDH 和 MDH 同工酶的遗传方式和连锁关系. 遗传学报, **14** (6): 428 ~ 425
- 葛颂, 王明庥, 陈岳武, 1988. 用同工酶研究马尾松群体的遗传结构. 林业科学, **24** (4): 399 ~ 409
- 葛颂, 1988. 同工酶与林木群体遗传变异研究. 南京林业大学学报, 1988, **12** (1): 68 ~ 77
- 葛颂, 1994. 酶电泳资料 and 系统与进化植物学研究综述. 武汉植物学研究, **12** (1): 71 ~ 84
- Bonnett - Masimbert M. and Bikay - Bikay V, 1978. Variabilite intraspecificque esisozymes de la glutamate - oxaloacetate transaminase chez *Pinus nigra* Arnold interet pour la taxonomie des sous especes. *Sil Genet*, **27**: 71 ~ 79
- Cai Q, Chinnappa C C, 1989. Studies on the *Stellaria longipes* polyploid complex (Caryophyllaceae): characterization of the genetic basis of isozymes. *Can J Bot*, **67**: 2960 ~ 2966
- Crawford D J, 1990. Plant Molecular Systematics: Macromolecular Approaches. New York: Wiley, 3 ~ 69
- Fowler D P, Morris R W, 1977. Genetic diversity in red pine; evidence for low genetic heterozygosity, *Can J For Res*, **7**: 343 ~ 347
- Gottlieb L D, 1973. Genetic control of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in the diploid plant *Stephanomeria exigua* and its allotetraploid derivative. *Biochem Genet*, **9**: 97 ~ 107
- Glaszmann J C, de los Reyes B G, Khush G S, 1988. Electrophoretic variation of isozymes in plumules of rice (*Oryza sativa* L.): A key to the identification to 76 alleles at loci. *IRRI Research Paper Series*, **134**: 1 ~ 14
- Gottlieb L D, 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann Mo Bot Gard*, **64**: 161 ~ 180
- Gottlieb L D, 1982. Conservation and duplication of isozymes in plant. *Science*, **216**: 373 ~ 380
- Hanrick J L, Linhart Y B, Mitton J B, 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically - detectable genetic variation in plants. *Annual Rev Ecol Syst*, **10**: 173 ~ 200
- Hanrick J L, Godt M J W, 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L et al. (eds.): Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Massachusetts: Sinauer Associate, Sunderland, 43 ~ 63
- Kephart S R, 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: A comparative analysis of techniques. *Amer J Bot*, **77** (5): 693 ~ 712
- Ledig F T, Conkle M T, 1983. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine. *Evolution*, **37**: 79 ~ 88
- O'Malley D M, 1979. Inheritance of isozyme variation and heterogeneity in *Pinus ponderosa*, *Biochem*, **17**: 233 ~ 250
- Soltis D E, 1983. Starch gelelectrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer Fern J*, **73** (1): 9 ~ 27
- Wang X - R, Szmidi A E, 1990a. Evolutionary analysis of *Pinus densata* Masters, a putative Tertiary hybrid. Allozyme variation. *Theor Appl Genet*, **80**: 635 ~ 640
- Wang X - R, Szmidi A E, 1990b. Evolutionary analysis of *Pinus densata* Masters, a putative Tertiary hybrid. A study using species - specific chloroplast DNA markers. *Theor Appl Genet*, **80**: 641 ~ 647
- Wang X - R, Szmidi A E, 1994. Hybridization and chloroplast DNA variation in a *Pinus* species complex from Asia. *Evolution*, **48** (4): 1020 ~ 1031
- Wheeler N C, Guries R P, 1982. Population structure, genic diversity, and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Can J For Res*, **12**: 595 ~ 606

- Woods J H, 1983. Amount and distribution of isozyme variation in ponderosa pine from Eastern Montana. *Sil Genet*, **32**: 151 ~ 157
- Yeh F C, Layton C, 1979. The organization of genetic variability in central and marginal population of lodgepole pine. *Can J Genet Cytol*, **21**: 487 ~ 503

### 图版说明

**图版 I** 图版中每个泳道点两粒胚乳的混合样, 若 2 粒胚乳某一位点的等位基因相同则出现一条谱带, 若等位基因不同则出现一高一低的两条谱带。1. LAP 2 个位点的电泳酶谱式样。2~3. AAT 2 个位点的电泳酶谱式样。4. ADH 3 个位点的电泳酶谱式样。5~6. PGD 2 个位点的电泳酶谱式样。7. MDH 4 个位点的电泳酶谱式样。8. GDH 1 个位点的电泳酶谱式样。9. SKD 3 个位点的电泳酶谱式样。10. ME 1 个位点的电泳酶谱式样。

**图版 II** 图版中每个泳道点两粒胚乳的混合样, 若 2 粒胚乳某一位点的等位基因相同则出现一条谱带, 若等位基因不同则出现一高一低的两条谱带。1~2. PGM 2 个位点的电泳酶谱式样。3. TPI 这 4 个位点的电泳酶谱式样。4. PGI 2 个位点的电泳酶谱式样。5~6. DIA 4 个位点的电泳酶谱式样。7. IDH 2 个位点的电泳酶谱式样。8. G6PD 1 个位点的电泳酶谱式样。

### Explanation of Plates

**Plate I** Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid) in the plates.

Fig.1. Banding pattern of two loci in LAP. Fig.2~3. Banding pattern of two loci in AAT.

Fig.4. Banding pattern of two loci in ADH. Fig.5~6. Banding pattern of four loci in DIA.

Fig.7. Banding pattern of four loci in MDH. Fig.8. Banding pattern of one locus in GDH.

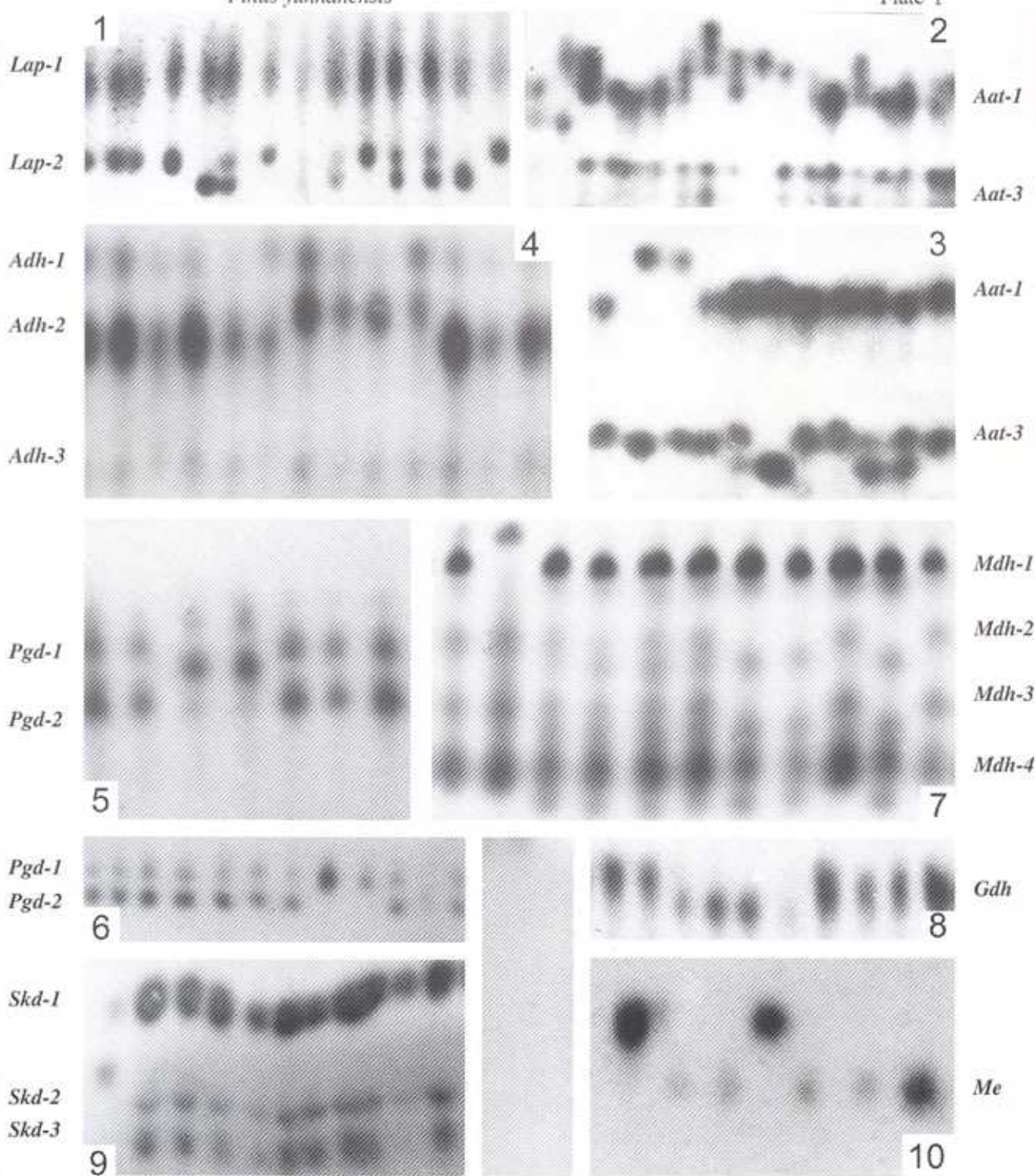
Fig.9. Banding pattern of three loci in SKD. Fig.10. Banding pattern of one locus in ME.

**Plate II** Every running lane has two samples of macrogametophytes (haploid) the plates.

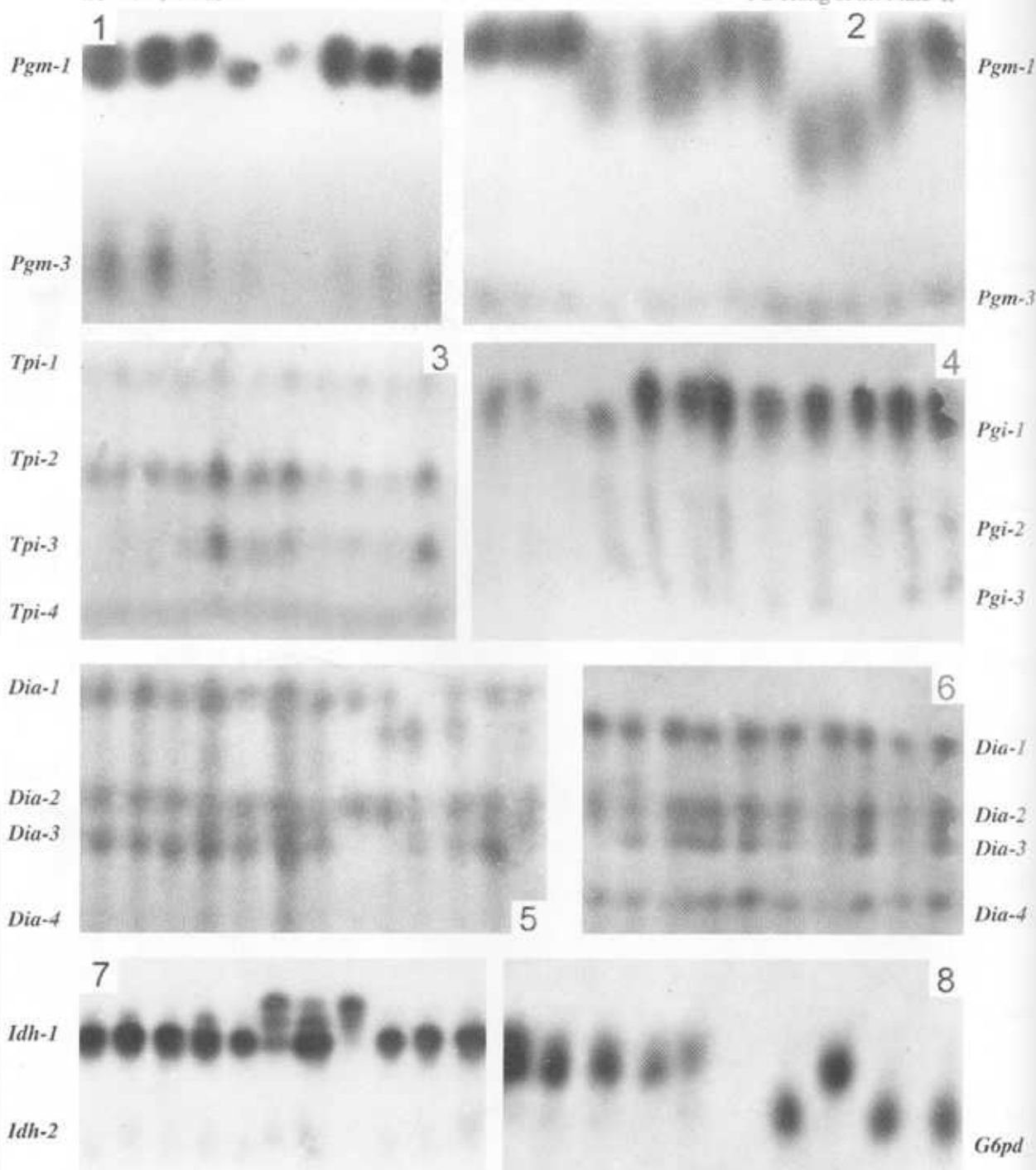
Fig.1~2. Banding pattern of two loci in PGM. Fig.3. Banding pattern of four loci in TPI.

Fig.4. Banding pattern of two loci in PGI. Fig.5~6. Banding pattern of four loci in DIA.

Fig.7. Banding pattern of two loci in IDH Fig.8. Banding pattern of one locus in G6PD.



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text